



Title	氷点下におけるウサギの血液の解糖作用
Author(s)	竹原, 一郎; TAKEHARA, Ichiro
Citation	低温科学. 生物篇, 14, 37-46
Issue Date	1956-11-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17585
Type	departmental bulletin paper
File Information	14_p37-46.pdf



氷点下におけるウサギの血液の解糖作用* **

竹 原 一 郎

(低温科学研究所 生物学部門)

(昭和31年7月受理)

I. ま え が き

血液保存の問題については既に多くの研究がなされ、保存中、赤血球に起る形態的、物理的、化学的变化に就いて種々の事実が知られている。その結果、血液にACD保存液を加え4~5°Cで保存する方法が現在常法として用いられている。しかし、この方法での有効保存期間は3週間位と言われているが、この間にも赤血球は種々の変化を受ける。そして、3週間保存された人血では85%、4週間のものでは65%の viability*** を示すという結果が得られている¹⁾。保存中に起こるこのような viability の低下を更に少なくする為には、保存血の物理的、化学的变化の性質や赤血球の代謝についての、より詳細な知識を得ることが必要と思われる。

体外で血液を長時間保存する為には、その代謝機能を出来るだけ正常に近い状態に保つのがよいか、或はそれを最小限まで低下させて置くことがよいか、と言う2つの方向が考えられるが、現在までの研究の多くは後者の方向がとられているようである。その結果、現在では一般に、低い pH と比較的低温(約5°C位)で保存する方法が採用されているわけである。

代謝機能を低下させるという目的からみれば、できるだけ温度を下げる事が望ましい。しかし血液は一たび凍結すると溶血してしまうので、氷点以下の温度の場合には血液を過冷却状態に保たねばならない。ところが現在まで過冷却状態における血液保存の試みは人血について2, 3あるもののかえつて常法より溶血度が甚だしいという単に否定的結果を得ているに過ぎず、系統立つた研究は殆んどなされていないといつてよい。はたして過冷却状態は血液の保存に対して全く不適當のものか、不適當とすればその原因はどこにあるかという問題をとり上げ、当研究所においては目下各方面から研究が進められている。この報告はその一環として行なっている血液の過冷却状態の下における解糖作用についての実験結果の一部である。

* 北海道大学低温科学研究所業績 第353号

** 本研究は文部省特殊研究費によるものである。

*** viability という言葉は、輸血後、赤血球が血管内に保たれている事を表わすのに用いられている。

II. 実験の方法

材料には家兔の血液を用いた。血液は心臓穿刺により無菌的に採取、凝固防止剤としては ACD 液を使用した。血液と ACD 液の容積の比は 4:1 である。ACD 液の組成は 100 cc 中クエン酸 0.48 g, クエン酸ソーダ 1.32 g, ブドウ糖 1.33 g である。

元来不安定な過冷却状態を長期間保つことは技術的に困難である。この実験では割合安定な -5°C という温度を選び、対照としては常法の $+5^{\circ}\text{C}$ をとつた。採血後、血液は綿栓した 50 cc の三角コルベンに 5~10 cc ずつ無菌的に分注し $+5^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 及び $-5^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ の恒温箱に保存した。そして一定の日時毎に必要な量を取り出し、静かに、充分攪拌した後分析した。

Incubation を行なう場合には、その血液を更に無菌的に試験管に適当量ずつ分注し、綿栓して、 $37^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の恒温水槽中に入れた。

乳酸²⁾, 焦性ブドウ酸³⁾, 無機燐⁴⁾, 及び幾つかの有機燐酸エステルを定量しそれからの変化を追及した。有機燐酸エステルの分析には Pappius et al⁵⁾ と殆んど同様の方法を用いた。即ち、血液を 9 或は 19 容の冷い 5% TCA (Trichloroacetic acid) で除蛋白し、できるだけ低温で濾過した。その濾液について、最初に存在する無機燐と、1N-HCl, 100°C で 10 分及び 100 分間の加水分解後生ずる無機燐を定量した。それらは夫々次の物を示す。(a)EH: 最初の 10 分間の加水分解で遊離して来る無機燐は主に ATP の末端の 2 個の燐酸基であるから、加水分解後に存在する無機燐から分解前の無機燐を差引いて 2 で割つた値を ATP の量とした。(b)DH: 10 分と 100 分の加水分解の間に遊離して来る無機燐は種々の糖の燐酸エステルから由来するものである。(c)Non-H: 100 分間の加水分解後も尚そのまま残っている燐酸エステルの主なものは、2, 3-DPG (2, 3-diphosphoglycerate) である。酸可溶性燐の全量より 100 分間の加水分解後に存在する無機燐を差引いて、2 で割つた値を 2, 3-DPG とした。

溶血の程度は全血のヘモグロビン量と血漿中のヘモグロビン量との百分率で表わした。ヘモグロビンの定量は, Khalifa & Salah⁶⁾ の方法によつた。

III. 実験の結果と考察

保存中の溶血の程度は第 1 表に示されているように、 -5°C に保存した血液の方が $+5^{\circ}\text{C}$ 保存のものよりすくない。6~7 時間 incubate した後でも同様である。

このように溶血は 4 週間保存した後でも、それ程多くはないので以下述べる結果に対し溶血の影響は考慮しなかつた。

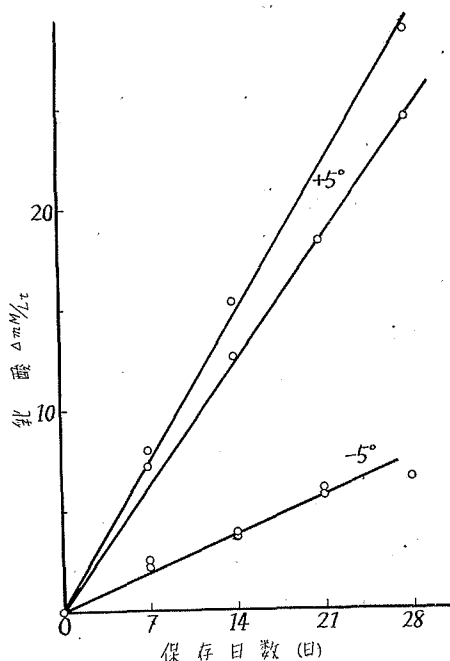
第 1 表 保存中の溶血度と 37°C で incubate した後の溶血度

保存日数	溶 血 度 (%)			
	Incubation の前		Incubation の後*	
	保 存 温 度 ($^{\circ}\text{C}$)		保 存 温 度 ($^{\circ}\text{C}$)	
	-5	+5	-5	+5
0	<0.04		<0.04	
7	<0.04	<0.03	0.1	0.1
14	0.3	0.4	0.7	1.2
21	0.4	0.7	1.2	2.5
28	—	1.0	—	3.7

* Incubation の時間は 6~7 時間

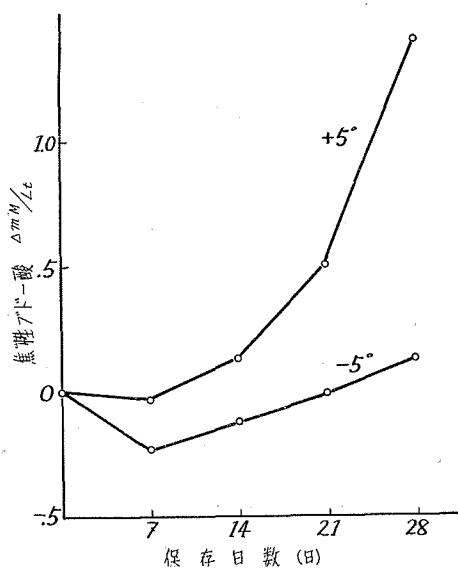
A. 保存中の解糖作用

第1図に示すように、保存温度が $+5^{\circ}\text{C}$ の場合も -5°C の場合も、血液中の乳酸の量は4週間保存の間に殆んど直線的に増加する。この結果から見れば、保存血の解糖の活性度は両温度の場合、各々著しい変化を蒙らずに一定の強さを保っており、且つこれら2つの温度における乳酸の生成量の差は予期されるように温度の差のみによることを示していると思われる。なお -5°C に保存された血液において、4週目には乳酸生成の速度が落ちてしまう結果も得られているが、更に保存期間を伸ばして乳酸量を測定して行かなければ、はつきりしたことは判らない。もしこれが事実とすれば興味あることである。



第1図 保存中の乳酸の変化

次に、焦性ブドウ酸の変化は第2図に示してある。 $+5^{\circ}\text{C}$ における保存血では、初めの10日目まで焦性ブドウ酸の増減が殆んど見られないが、その後3週間目あたりから急速な増加が起る。このような傾向は、Denstedt et al^{(5), (7), (8)}によつて人間の保存血の場合にも報告されている。これに反し、 -5°C に保存された血液では、最初の同じ期間に先ず急速な減少が起り、その後徐々に増加して来て2~3週間目で初めの値まで戻り、その後は大体同じ速度で増加し続ける。なお $+5^{\circ}\text{C}$ の保存血でも、1週間以内での焦性ブドウ酸の急速な減少が起る場合もあつた。しかも、その減少速度は、 -5°C の場合に比べ、特に小さいものではないが焦性ブドウ酸の初めの量までの回復は -5°C の場合より遙かに速いようである。 $+5^{\circ}\text{C}$ におけるこのような結果がウサギの個体によるものか、否かは未だ確かめていない。

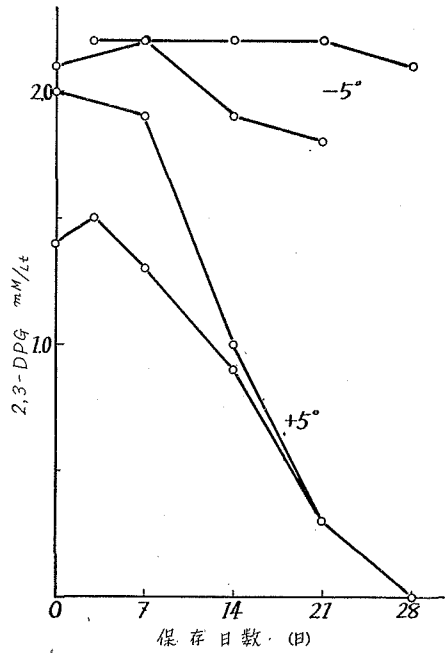


第2図 保存中の焦性ブドウ酸の変化

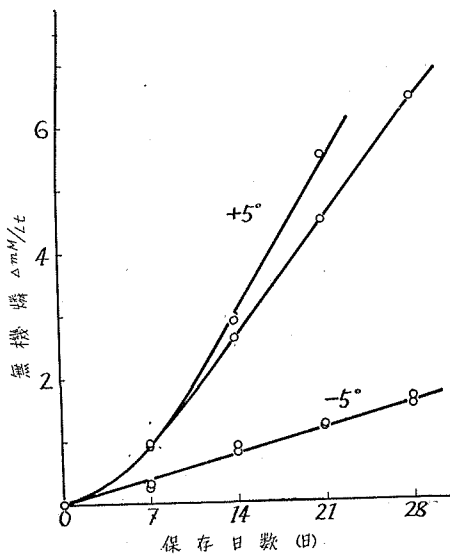
Denstedt⁽⁵⁾はクエン酸ソーダのみ、或はクエン酸ソーダとブドウ糖を加えた人間の保存血において、焦性ブドウ酸の変化は2, 3-DPGと密接な関係にあることを示している。即ち、この2, 3-DPGの生成までの段階で解糖作用に

何らかの障害が起ると、2, 3-DPG の生成が減退する結果、2, 3-DPG が代謝されて行く速度はその生成速度を上廻るようになる。それに伴なつて DPN (Diphosphopyridine nucleotide) の還元速度も又低下する。還元型の DPN (DPN-H₂) は焦性ブドウ酸が乳酸に還元されるのに必要であるから、結局この還元のプロセスも阻害されることになる。従つて2, 3-DPG は減少し、それと同時に焦性ブドウ酸の蓄積が起るといふのである。しかし、Denstedt によれば、ACD 液を加え +5°C に保存した人間の血液では2, 3-DPG の加水分解が保存の最初から起つて10~14日の間にその最小量に達してしまい、2, 3-DPG と焦性ブドウ酸との間に相互関係が見られなと述べている⁹⁾。これに反して、Blanchaer & Baldwin¹⁰⁾ は同じく ACD 液を加えた人間の保存血で最初の3週間の間は焦性ブドウ酸蓄積の速度が2, 3-DPG の消失の速度と密接に関係していることを示している。

ウサギの場合にも +5°C で保存された血液では第3図に明かなように、保存7日以後に2, 3-DPG の急速な減少が見られる。この減少の時期は焦性ブドウ酸の増加し始めるのと大体



第3図 保存中の2, 3-DPGの変化



第4図 保存中の無機燐の変化

一致している。-5°C に保存された血液では、2, 3-DPG の減少が余りなく、焦性ブドウ酸の蓄積も多くはないという結果が得られている。しかしこれだけの結果から、この場合にも2, 3-DPG と焦性ブドウ酸との間に密接な関係があるということは出来ない。

第4図には無機燐の変化を示した。+5°C に於ける無機燐の増加は-5°Cのそれに比べ遙かに著しく、1週目で-5°Cの場合の2~3倍であつたものが、4週目では4~6倍位になつている。この増加の一部は2, 3-DPG の代謝の際に遊離される燐酸によるものであろう。

第2表に示したように、ATP は保存中減少するが、保存温度による差は余り大きな

第2表 保存中の ATP の変化

保存温度 (°C)	A T P mM/Lt					
	保 存 日 数					
	0	3	7	14	21	28
+5	0.7	0.8	0.8	0.6	0.3	—
	0.6	—	0.6	0.5	0.5	0.3
	0.9	—	—	0.8	0.5	—
	0.6	—	0.5	0.4	0.3	
-5	0.8	—	0.4	0.4	0.3	0.2
	0.8	0.4	0.4	—	0.4	0.3
	0.7	—	0.5	0.4	—	—

い。現在までのところ、この原因については何も判っていない。

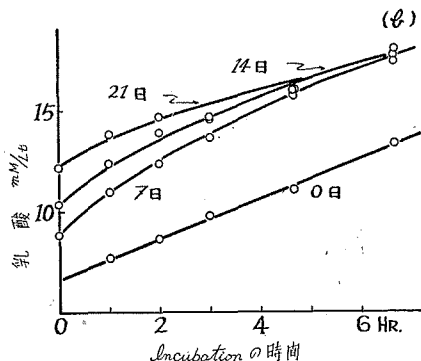
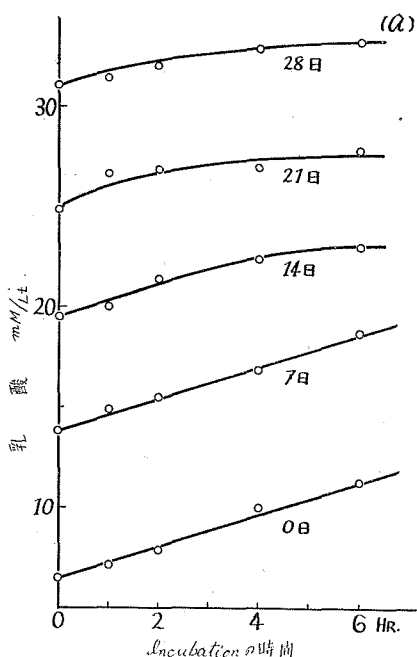
B. 37°C に incubate した場合の保存血の解糖作用

保存中に血球の解糖の過程に何らかの変化が起つたとすれば、保存後その血液を 37°C で incubate した場合、解糖の様子は採血直後、同じ条件で incubate された血液のそれとは違ってくるはずである。この点を確認する為に次の実験を行なった。

採血後、血液を 5~10 cc ずつ三角コルペンに無菌的に分注し、+5°C 及び -5°C で保存した。一方血液の一部はただちに適当量ずつ試験管に無菌的に分注して、37°C で incubate し、

一定時間毎に分析した。保存した血液は一定日時後、対照と同じ操作でその変化を調べた。

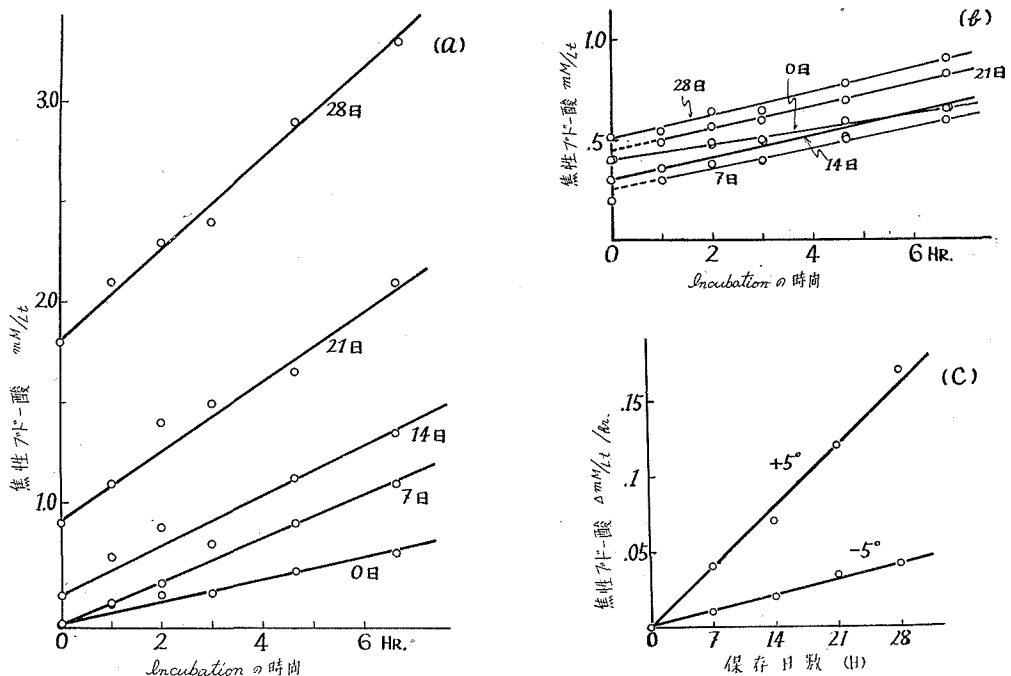
先ず保存期間によつて、37°C で incubate した場合の乳酸生成速度が如何に変化するかを調べた。(第5図, a, b)。+5°C の場合、1週間後では乳酸生成の初速度は対照と殆んど変わりなく、更に保存期間



第5図 37°C で incubate した場合の乳酸の変化
 (a) +5°C で保存した血液
 (b) -5°C で保存した血液

が長びくにつれて次第に低下し、4週間後には対照の約1/2位になる。これに対し -5°C では1週間保存後、乳酸生成の初速度は対照の約2倍に増大している。この増大の程度は保存期間が長くなるにつれて次第に低下し、3週間後対照と殆んど同じになる。この incubation の際に起こる乳酸生成速度の増大は、 $+5^{\circ}\text{C}$ の場合にも2~3日保存された血液において僅かではあるが認められた。人血においても、 $+4^{\circ}\text{C}$ 、2~3日保存した血液で例外的に同様のことが見られるという (Denstedt⁹⁾)。この生成速度の増大は多分温度の影響をより強く受ける段階で中間体の蓄積が起つていて、 37°C に incubate されると、それが急速に代謝されるためと考えられる。このように考えれば、焦性ブドウ酸が -5°C に保存された血液で初め急速に減少することも一応説明することが出来る。この点を明かにするには、保存中に起こる中間体の変化を詳細に調べることが必要である。その一歩として、Triose phosphate について予備的試みを行なつた。即ち、1N-NaOH, 20°C で20分間に遊離してくる無機燐を定量してみた(この条件の下ではATPも約15%位分解する)。更に、LePageの分割も試みたが何れの場合にも再現性ある結果が得られなかつた。

37°C に incubate された時の焦性ブドウ酸の変化について得られた結果は次の通りである(第6図, a, b, c)。 $+5^{\circ}\text{C}$ の保存血では、保存日数の増加につれて焦性ブドウ酸生成の速度は大きくなる。又 -5°C 保存のものでも保存日数が長くなるにつれて、その生成速度の増大は見ら



第6図 37°C で incubate した場合の焦性ブドウ酸の変化

(a) $+5^{\circ}\text{C}$ で保存した血液 (b) -5°C で保存した血液

(c) $+5^{\circ}\text{C}$ 及び -5°C 保存血の 37°C における焦性ブドウ酸生成速度の比較

第3表 37°C で incubate した場合の 2, 3-DPG の変化

保存温度 (°C)	Incubation の時間	2, 3-DPG mM/Lt					
		保 存 日 数					
		0	3	7	14	21	28
+ 5	0	2	1.8	1.9	1.4	0.3	0
	1	2	1.8	1.5	0.8	0	—
	2	2	1.6	1.3	0.4	0	—
	4	1.6	1.3	0.9	0	0	—
	0	1.4	1.5	1.3	0.9	0.3	0
	1	1.3	1.3	1.2	0.7	0	—
	2	1.2	1.0	0.9	0.3	0	—
	4	1.0	1.0	0.7	0	0	—
- 5	0	—	2.2	2.2	1.9	1.8	—
	1	—	2.1	1.9	1.9	1.7	—
	2	—	2.0	2.0	2.0	1.6	—
	4	—	1.7	1.8	1.5	1.2	—
	0	2.1	—	2.2	2.2	2.2	2.1
	1	1.9	—	2.1	2.0	2.0	—
	2	1.9	—	1.5	2.0	1.9	1.9
	4	1.4	—	1.7	1.6	1.7	1.6

れるが、第6図(c)に示すようにその増加の程度は+5°Cのその約1/4に過ぎない。この場合の増加も保存中の場合のように、2, 3-DPGと関連づけることが出来るであろうか。第3表からも明かなように、確かに2, 3-DPGはincubationの時間と共に減少し、保存日数が長くなるにつれて、その減少速度も増しているようである。しかも、これらの変化は+5°C保存の場合の方が甚だしい。しかしながら、3~4週間で2, 3-DPGが殆んど消失してしまっているのにも拘らずincubationの際の焦性ブドウ酸の増加は更に大きくなっている。このことは2, 3-DPGとの関係からだけでは説明出来ない。+5°Cにおける保存中の変化の場合にも、3週以後、同様のことが見られている。焦性ブドウ酸が常に蓄積する傾向があるところから見ればその生成が乳酸への還元を上廻っていると考えられよう。とすれば2, 3-DPGの消失してしまつた後で、それに代るべき何らかの中間体の蓄積がそれまでに起つていたとは考えられないから、焦性ブドウ酸までの解糖の系が比較的充分活動していると考えてよいであろう。この系が動いていれば、それに相当したDPNの還元も起つている筈である。Blanchaer & Baldwin⁹⁾によれば、ACD液を加えた人間の保存血(+5°C)で30日以後に起こる焦性ブドウ酸の蓄積は、DPN, flavoprotein及びhaemoproteinを通しての3-phosphoglyceraldehydeの好氣的酸化によるものであるという。ウサギの場合にも、このような系が存在するとすれば、焦性ブドウ酸の蓄積が起こるのはDPN・H₂が焦性ブドウ酸の還元以外にも使われるためであるとも考

第4表 37°Cで incubate した場合の ATP の変化

保存温度 (°C)	Incubation の時間	A T P mM/Lt					
		保 存 日 数					
		0	3	7	14	21	28
+ 5	0	0.6	0.5	0.5	0.4	0.3	—
	1	0.5	0.5	0.4	0.3	0.3	—
	2	0.5	0.45	0.4	0.3	0.2	—
	4	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	—
- 5	0	0.8	—	0.4	0.4	0.3	0.2
	1	0.8	—	0.5	0.3	0.2	0.2
	2	0.75	—	0.4	0.4	0.2	0.2
	4	0.6	—	0.4	0.3	0.2	0.2

えられる。このように考えれば実験結果の一応の説明は出来る。

次に示すように、保存血を 37°C に incubate しても、ATP 量の回復はなく、僅か減少するのが見られる(第4表)。このことは incubation の際に無機燐が更に増加することからも予期される。しかし、このような複雑な系では specific な ATP の定量法を用いなければ、明確な結果を得ることは出来ない。

以上述べたように、保存中に於ける ATP の変化以外は何れも、予期されるように保存温度による変化の差を示している。即ち、一般的に乳酸、焦性ブドウ酸、無機燐の増加、及び 2, 3-DPG の減少は、通常の化学反応と同様、保存温度の高い方(+5°C)が低い方(-5°C)より著しいという結果を示している。又、37°C で incubate した場合の変化で特に興味あるのは、-5°C 保存血の 37°C における乳酸生成速度が保存 1 週間後、約 2 倍に増大している点であるが、その他焦性ブドウ酸の蓄積、2, 3-DPG の減少、無機燐などは更に増加する(何れも +5°C 保存血の方が著しい)。現在までのところ、このような保存温度による差が判つたに過ぎない。今後はこれら変化の相互関係や 37°C に於ける乳酸生成速度増大の原因などを調べて行きたいと考えている。

摘 要

ACD 液を加えたウサギの血液を -5°C で保存し、その間に起こる乳酸、焦性ブドウ酸、2, 3-DPG、無機燐、ATP などの変化、及び保存した血液を 37°C で incubate した場合の同じ変化を +5°C で保存した血液と比較しながら調べた。

A. 保存中に起こる変化；乳酸は +5°C でも -5°C でも、4 週間保存の間、殆んど直線的に増加し、その生成速度は +5°C の方が -5°C の約 3~4 倍であつた。焦性ブドウ酸の蓄積も +5°C の方が著しく、保存 1 週目では殆んどその蓄積は見られないが、その後は次第に増加し、その生成速度も、保存が長びくと共に増大する。これに対し、-5°C では初め急速な減少

があつて、その後徐々に蓄積が起こるが、その生成速度は殆んど一定であつた。2, 3-DPG も -5°C では余り減少しないが $+5^{\circ}\text{C}$ では保存1週目位から急速に減少し始め4週目では殆んど完全に消失してしまうようである。無機燐の増加も同様 $+5^{\circ}\text{C}$ で甚だしいが、ATPの減少では両保存温度の間に差は認められなかつた。

B. 37°C で incubate した場合の変化；採血直後の血液を対照として、 $+5^{\circ}\text{C}$ 及び -5°C 保存の血液に起る変化を比較した。 $+5^{\circ}\text{C}$ 保存血では、 37°C で incubate した場合、乳酸の生成速度は保存1週目で対照と殆んど同じであるが、その後次第に低下する傾向が見られた。 -5°C の血液では、保存1週後、その生成速度が対照の約2倍に増大するが、これも次第に低下する。 37°C における焦性ブドウ酸の生成速度に保存日数と共に増大するが、その増加の程度は $+5^{\circ}\text{C}$ の方が大きく、 -5°C の場合の約3倍位であつた。2, 3-DPGの減少も又 $+5^{\circ}\text{C}$ 保存血の方が著しい。ATPは保存中の変化と同様に、保存温度による明かな差は認められなかつた。

御指導、御鞭撻を賜りました青木先生、根井先生、種々御批判を頂きました理学部生物化学教室の山崎さんに厚く感謝する。

文 献

- 1) Gabrio, B. W. & C. A. Finch 1954 Erythrocyte preservation. I. The relation of the storage lesion to in vitro erythrocyte senescence. *J. Clin. Invest.*, **33**, 242.
- 2) LePage, G. A. 1949 *Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism*. Burgess Publishing Co., (Minneapolis).
- 3) Friedeman, T. E. & G. E. Haugen 1943 Pyruvic acid. II. Determination of keto acids in blood and urine. *J. Biol. Chem.*, **147**, 415.
- 4) Fiske, C. H. & Y. Subbarow 1925 The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375.
- 5) Pappius, H. M., S. R. Aandreae, V. R. Woodford & O. F. Denstedt 1954 Studies on the preservation of blood. I. Glycolytic behavior of blood during storage at 5°C in a medium containing an excess of glucose. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **32**, 271.
- 6) Khalifa, A. A. & M. K. Salah 1951 Spectrophotometric determination of haemoglobin in blood. *Nature*, **168**, 915.
- 7) Pappius, H. M. & O. F. Denstedt 1954 Studies on the preservation of blood. II. The glycolytic behavior of blood during storage. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **32**, 293.
- 8) Denstedt, O. F. 1953 *The enzymology of the erythrocyte*. Blood Cell and Plasma Proteins. Academic Press, (New York) pp. 223-253.
- 9) Blanchaer, M. C. & S. L. Baldwin 1953 Pyruvate accumulation in preserved blood. *J. Appl. Physiol.*, **6**, 8.

Résumé

With rabbit blood stored in ACD preservative, some experiments were made on how the temperatures of storage exerts influence on the glycolytic behavior. The storage temperatures employed were $+5^{\circ}\text{C}$ and -5°C ; in the latter case the blood was in the supercooled state.

After 3 weeks of storage, the haemolysis values of the blood stored at $+5^{\circ}\text{C}$ and -5°C were 0.7 and 0.4 per cent respectively.

The rate of lactate formation at $+5^{\circ}\text{C}$ was about three times as great as at -5°C , and the content of inorganic phosphate was found to be greater at $+5^{\circ}\text{C}$ than at -5°C storage. The level of ATP somewhat decreased during storage, however it seems to be independent of the storage temperatures.

The behavior of pyruvate was, in some points, different from the foregoing. In blood stored at $+5^{\circ}\text{C}$, the only a slight change of pyruvate took place during the 1st week of storage; thereafter an accumulation of pyruvate was found and the rate of its formation increased with prolongation of the time of storage. At -5°C , on the contrary, a rapid fall in pyruvate occurred during the 1st week of storage, followed by an accumulation at constant rate.

Rapid decrease in 2, 3-DPG, at $+5^{\circ}\text{C}$, started about 7th day of storage and it disappeared completely about 28th day, but at -5°C , there was only a little decrease during the same period. It seems that there may be some connection between the rise in pyruvate and the fall in 2, 3-DPG in blood during storage.

The glycolytic behavior of preserved blood when returned to 37°C was also studied. After the 1st week of storage, the rate of lactate formation at 37°C with $+5^{\circ}\text{C}$ -preserved blood specimens tended to diminish with increase in the period of storage. With 2~4-day-old blood, it seems that the rate was greater than that of fresh blood, but it decreased again to the level of the fresh blood about the 7th day of storage. With -5°C -preserved blood, on the other hand, the initial rate of lactate formation in 7-day-old blood was about twice as great as that of fresh blood and thereafter its rate gradually diminished with increase in the period of storage. Such an increase in the initial rate of lactate formation with older blood specimens may be attributed to the rapid metabolism of the glycolytic intermediate at 37°C , which has accumulated in blood during storage at -5°C .

When returned to 37°C , the rate of pyruvate accumulation increased with prolongation of storage in both blood specimens preserved at $+5^{\circ}\text{C}$ and -5°C respectively. The degree of the increase in that rate, however, in the former case was about three times as great as that in the latter.

A fall in 2, 3-DPG was found also in preserved blood when returned to 37°C ; more rapid fall and eventual disappearance in $+5^{\circ}\text{C}$ -preserved blood, more gradual fall in -5°C -preserved blood.